

УДК 576.893.195 : 595.782

**МИКРОСПОРИДИОЗ ПЧЕЛИНОЙ ОГНЕВКИ
GALLERIA MELLONELLA (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE),
ВЫЗЫВАЕМЫЙ VAIRIMORPHA EPHESTIAE
(MICROSPORIDIA: BURENELLIDAE)**

© Я. Л. Воронцова, Ю. С. Токарев, Ю. Я. Соколова, В. В. Глупов

Экспериментальный микроспоририоз гусениц лабораторной популяции пчелиной огневки вызвали пероральным заражением личинок младших возрастов и внутривентральными инъекциями спор микроспоририды *Vairimorpha ephestiae*. Были изучены особенности протекания микроспоририоза, проявления защитных реакций хозяина, а также влияние температуры содержания гусениц и условий хранения спор на восприимчивость насекомых к заражению. Влияние микроспоририды на организм хозяина проявлялось в ранней гибели или задержке развития личинок; однако в ряде случаев внешние проявления воздействия паразита на хозяина отсутствовали. Развитие паразитов от момента заражения до появления скоплений зрелых спор в организме хозяина продолжалось 6 суток. Микроспоририды инвазировали жировое тело насекомых, вызывая его гипертрофию и исчезновение липидных гранул. В кишечнике и слюнных железах в период с 6 до 16 сут развития микроспоририды не наблюдали. На конечном этапе микроспоририоза все содержимое клеток жировой ткани замещалось спорами микроспоририды. При микроскопировании зараженных и погибших особей были выявлены только диплокариотические споры ноземного типа, но не октоспоры. Споры выбрасывали полярные трубки при смене pH раствора инкубации с нейтрального на щелочной. Влияние микроспоририоза на гемолимфу пчелиной огневки проявлялось в увеличении относительной доли прогемоцитов, в появлении на 6-й день после заражения многоядерных свободно-циркулирующих клеток и в подавлении реакции меланизации гемолимфы при массовом спорогенезе паразита. Выявлен характерный симптом микроспоририоза пчелиной огневки: отложение под кутикулой черных точек и мелких пятен неправильной формы («реакция атретизации»). Повышение температуры содержания насекомых до 32° в течение 3 дней после заражения способствовало полному избавлению насекомых от инфекции в первом и втором поколениях, что можно рассматривать как способ оздоровления лабораторных колоний пчелиной огневки от микроспоририоза. Пероральное заражение гусениц III и IV возрастов спорами, хранившимися 3–6 мес. при $t = 4^\circ$ в виде водной суспензии, вызывало гибель 63.0–61.5 и 91 % гусениц, содержащихся соответственно при $t = 25$ и 21° , а при температуре содержания 30° смертность не отличалась от контроля (8–10 %). Споры, выделенные из высушенных трупов гусениц, утратили жизнеспособность, что было продемонстрировано тестом на инфекционность *in vivo* и окрашиванием акридиновым оранжевым. Данная паразито-хозяинная система представляется перспективной для изучения механизмов резистентности насекомых и иммуносупрессивных свойств энтомопатогенных микроспоририды.

Пчелиная огневка *Galleria mellonella* — один из традиционных объектов лабораторных исследований, в том числе для изучения механизмов рези-

стентности насекомых (Weisner et al., 1991; Dunphy, 1994; Глупов и др., 1997; Brivio et al., 2002; Yu et al., 2002; Seitz et al., 2003). Восприимчивость пчелиной огневки к микроспоридиям позволяет в перспективе создать уникальную паразито-хозяйинную модель для анализа влияния микроспоридий на различные параметры организма насекомого-хозяина. Этому, с одной стороны, способствует наличие соответствующих методических подходов к изучению микроспоридиозов, а с другой — большой объем информации о биологии и физиологии *G. mellonella*. Настоящая работа является первым этапом создания такой модельной системы и ставит своей целью описание особенностей патогенеза микроспоридиоза, вызываемого *V. ephestiae* при заражении личинок пчелиной огневки. Нами были изучены особенности протекания заболевания, проявления некоторых защитных реакций хозяина, влияние температуры содержания гусениц на восприимчивость насекомых к заражению, а также влияние условий хранения спор на инвазионность последних.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Разведение насекомых и очистка спор микроспоридий. Пчелиную огневку разводили в лабораторных условиях. Гусениц содержали в темноте, на искусственной питательной среде при $t = 28-32^{\circ}$ (Тамарина, 1987). В экспериментах использовали микроспоридию *Vairimorpha ephestiae*, выделенную из мельничной огневки *Ephestia kuehniella* и инфекционную для пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Weiser, Purrini, 1985). Споры микроспоридий, использованные в опытах по заражению, получали из гомогенатов жировых тел и целых гусениц из зараженной культуры. Очистку спор проводили методом многократного центрифугирования в дистиллированной воде (200 г, 5—15 мин).

Экспериментальное заражение насекомых. Было испытано 2 способа заражения гусениц.

Пероральное заражение (Vavra, Maddox, 1976). Гусениц III и IV возрастов окунали на 1 с в водную суспензию спор (10^5 спор $\times$ мл $^{-1}$), после чего помещали на искусственную питательную среду в чашки Петри. Контрольную группу насекомых вместо суспензии спор окунали в дистиллированную воду. Поскольку споры выбрасывают полярные трубки только при попадании внутрь организма хозяина вместе с поедаемой средой, такой тип заражения является по сути пероральным.

Перкутанное заражение осуществляли, инъецируя каждой гусенице с помощью микроинъектора 3 мкл суспензии, содержащей 40—80 спор в стерильном 0.9 %-ном NaCl. Споры предварительно обрабатывали раствором стрептомицина (1 мг $\times$ мл $^{-1}$) и ампициллина (0.2 мг $\times$ мл $^{-1}$) в течение 5 мин, после чего последовательно разводили суспензию спор стерильной дистиллированной водой в 2 и 4 раза, инкубировали по 15 мин, затем отмывали споры 4 раза стерильным 0.9 %-ным NaCl.

Световая микроскопия. Начиная с момента заражения, каждые 2 дня часть насекомых препарировали в 0.1 М Na-фосфатном буфере (pH 7.2) (ФБ) и оценивали зараженность спорами тканей кишечника, жирового тела, гемолимфы и слюнных желез, используя световой микроскоп, оснащенный фазово-контрастной оптикой. На 6, 12 и 15-е сут отпрепарированные ткани зараженных и контрольных гусениц (по 3—4 гусеницы в варианте) фиксировали 2.5 %-ным раствором глутарового альдегида в ФБ

в течение 60 мин, отмывали в 0.1 М какодилатном буфере (КБ) и постфиксировали 1 %-ным раствором тетроксид осмия в КБ 1 ч. После серии отмывок дистиллированной водой материал обезвоживали в этаноле и ацетоне и заливали в эпон-аралдит (Соколова и др., 1994). Полутонкие срезы, изготовленные на ультратоме LKB, окрашивали метиленовым синим в течение 3—5 мин с подогревом на спиртовке (Логинов и др., 1988) и изучали в световой микроскоп.

Отбор и анализ гемолимфы. Покровы гусениц прокалывали стеклянным капилляром и отбирали выступающую гемолимфу в капилляр. Капилляры с нативной гемолимфой оставляли при комнатной температуре и в течение 20 мин наблюдали за меланизацией образца. При исследовании гемоцитов гемолимфу, полученную от 3 зараженных гусениц, немедленно смешивали с антикоагулирующим буфером (Leonard et al., 1985), содержащим следовые количества фенилтиомочевины. Гемоциты осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, окрашивали 10 мин на ледяной бане акридиновым оранжевым (АО) в ФБ в концентрации $0.01 \text{ мг} \times \text{мл}^{-1}$ (Weidner, Sibley, 1985) и трижды отмывали в ФБ в присутствии 40 мМ этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА). Образцы гемоцитов, окрашенные АО, наносили на предметное стекло, добавляли 4 мкл 1 %-го 1,4-фенилендиамина в глицерине в ФБ и покрывали предметным стеклом. Препараты просматривали в световой микроскоп Opton-Axioscope (ZEISS, Германия), оснащенный эпифлюоресцентной приставкой и цифровой фотокамерой.

Для определения влияния температуры на развитие заболевания чашки с контрольными и перорально зараженными гусеницами содержали при $t = 22$ или 28° на протяжении всего опыта. Группу из 20 гусениц содержали при $t = 32^\circ$ в течение 3 дней с момента заражения, а затем при $t = 28^\circ$.

Для изучения сохранности инфекционного начала при разных условиях хранения спор гусениц III возраста заражали спорами, выделенными из высушенных трупов, гомогенизированных в дистиллированной воде; а также помещали яйца гусениц в чашки с погибшими от микроспоридиоза гусеницами, хранившимися 2 недели при $t = -20^\circ$. Гусениц содержали при постоянной температуре 28° .

Для изучения условий стимуляции выстреливания полярных трубок спорами микроспоридий *in vitro* был использован метод щелочной обработки, первоначально предложенный для *Nosema bombycis* (Vavra, Maddox, 1976) и позже модифицированный для *N. furnacalis* (Kurtti et al., 1994). Споры инкубировали 30 мин в растворе 10 мМ ЭДТА, забуференном 1 мМ Трисом (pH 7.0), затем осаждали центрифугированием и ресуспендировали в растворе, содержащем 0.01 Н КОН и 0.17 М KCl. Через 40 мин споры вновь центрифугировали и нейтрализовали раствором, содержащим 25 мМ Трис, 0.17 М KCl, 10 мМ ЭДТА, 30 мМ глюкозы (pH 8.0). В течение 30 мин наблюдали экструзию спор в микроскоп Axiovert 2 (ZEISS, Германия) с использованием фазово-контрастной оптики. Процент выстреливших спор рассчитывали по формуле Эббота (Undeen, Vavra, 1997) при подсчете не менее 400 спор.

Достоверность различий между показателями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ($p < 0.05$) (Плохинский, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспериментальное заражение и симптомы микроспориоза. Гусеницы *G. mellonella* заражались перорально или перкутанно спорами микроспоридии *V. ephestiae*. В обоих случаях через 6 сут после заражения в жировом теле гусениц были обнаружены массовые скопления зрелых спор и внутриклеточных стадий развития микроспоридий. Споры микроспоридий исключительно ноземного типа были хорошо видны на мазках тканей зараженных гусениц в световой микроскоп при наблюдении как в светлом поле, так и с использованием фазового контраста. Внутриклеточные стадии развития микроспоридий были мало заметны в светлом поле, при фазовом контрастировании они выглядели как темные тела правильной округлой (меронты и споронты) или удлинненной (споробласты) формы (рис. 1).

Не ранее, чем на 14-е сут заболевания отмечено наступление фазы конечного (острого) микроспориоза, характеризующегося гипертрофией жирового тела и замещением содержимого клеток жировой ткани насекомого массой зрелых спор микроспоридий. Гусеницы при этом приобретали молочно-белую окраску, которая обусловлена массовым скоплением в жировом теле спор, просвечивающих сквозь покровы.

Характерный симптом микроспориоза пчелиной огневки — появление под кутикулой черных точек и мелких пятен неправильной формы. Это явление наблюдали примерно у 50 % зараженных гусениц. При препарировании этих участков и изучении их с помощью светового микроскопа отмечена ассоциация черных пятен с массами спор микроспоридий.

Принципиальных различий в зараженности, смертности и патогенезе при разных способах заражения не было выявлено. Поскольку метод иммерсии гусениц в суспензию спор, рассматриваемый нами как пероральный, гораздо менее трудоемок и сложен, чем инъектирование, дальнейшие эксперименты проводили на гусеницах, зараженных перорально.

При успешном заражении в экспериментальной группе регистрировали гибель гусениц и отставание в развитии некоторых насекомых. В гусеницах, развивавшихся без задержки, регистрировались одиночные споры (слабая зараженность) или отсутствие видимой инфекции. Такие гусеницы благополучно окукливались и превращались в бабочек.

Гистологический анализ зараженных гусениц. Просмотр полутонких срезов тканей гусениц, фиксированных на 6, 12 и 15-е сут после заражения, не выявил присутствия паразитов в клетках эпителия кишечника и слюнных желез; в то же время клетки, прилежащие к стенке кишечника, в том числе мелкие клетки, возможно, гемоциты, содержали группы спор микроспоридий (рис. 2, а). В клетках жирового тела отмечено интенсивное развитие паразитов; споры и dospоровые стадии развития идентифицировались на полутонких срезах, окрашенных метиленовым синим начиная с 6 сут после заражения (рис. 2, б). Примерно на 12-е сут жировая ткань делится на интенсивно заполненные паразитами области, в которых липидные гранулы практически отсутствуют, и свободные от инфекции зоны, содержащие многочисленные гранулы липидов (рис. 2, в). На 15-е сут все содержимое цитоплазмы клеток гипертрофированной жировой ткани замещалось стадиями спорогонии и зрелыми спорами, липидные гранулы практически не встречались.

Реакция гемолимфы на экспериментальное заражение. На 6-е сут после заражения в гемолимфе гусениц с признаками микро스포-

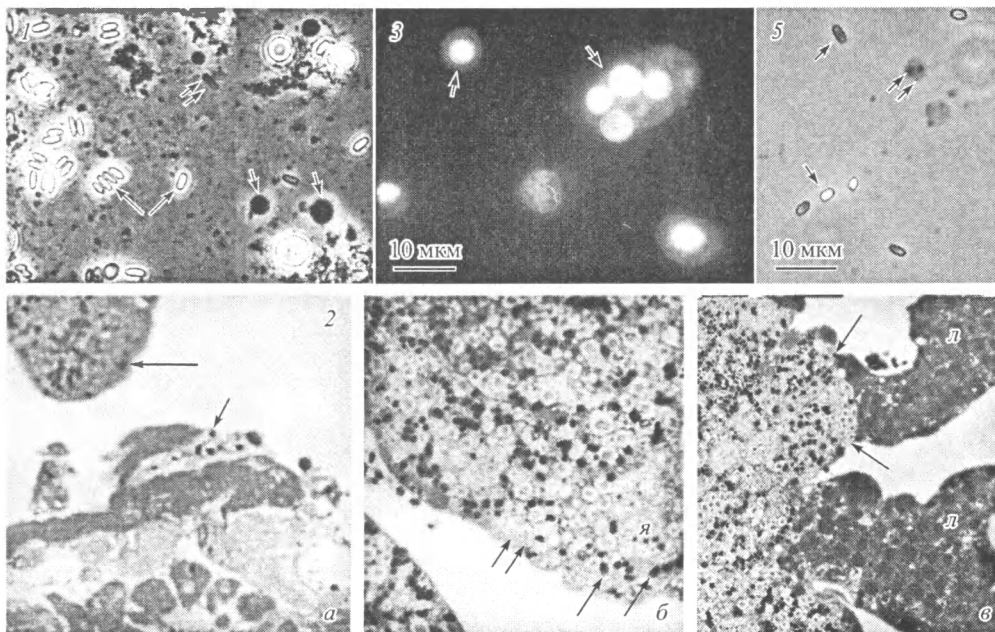


Рис. 1. Мазок жирового тела гусениц *G. mellonella* через 6 суток после заражения *V. ephestiae*. Фазовый контраст.

Большая стрелка — зрелые споры, малая стрелка — пролиферативные стадии, двойная стрелка — споробласт.

Fig. 1. A smear of fat body from *G. mellonella* caterpillars in 6 day after infection by *V. ephestiae*. Phase contrast microscopy.

Рис. 2. Клетки, прилежащие к стенке кишечника гусениц *G. mellonella* (а) и клетки жирового тела (б, в), зараженные *V. ephestiae*. Полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим.

Большая стрелка — зрелые споры, малая стрелка — пролиферативные стадии, двойная стрелка — липидные гранулы. л — участки клеток с большим количеством липидов и не содержащие паразитов, я — ядро. Увеличение: а, б — $\times 600$; в — $\times 300$.

Fig. 2. Cells adjacent to the intestinal wall in *G. mellonella* caterpillars (a) and fat body cells (b, c) infected by *V. ephestiae*. Semi-thin sections, methylene blue staining.

Рис. 3. Гемолимфа гусениц *G. mellonella*, на зараженных *V. ephestiae*, окрашивание акридиновым оранжевым.

Малая стрелка — прогемоцит, большая стрелка — многоядерный гемоцит.

Fig. 3. Haemolymph of *G. mellonella* caterpillars infected by *V. ephestiae*, acridine orange staining.

Рис. 5. Экструзия полярных трубок спор микроспоридий *V. ephestiae* через 2 ч после нейтрализации щелочного раствора.

Малая стрелка — интактная спора, большая стрелка — выстрелившая спора, двойная стрелка — диплокариотическая стадия.

Fig. 5. Extrusion of polar tubes of microsporidian *V. ephestiae* spores in 2 hours after neutralization of alkaline solution.

ридиоза содержание прогемоцитов составило 7.2 ± 1.29 % от общего количества гемоцитов, тогда как у контрольных гусениц доля прогемоцитов никогда не превышала 0.5 %. Кроме того, в гемолимфе больных гусениц были выявлены многоядерные гемоциты (рис. 3), никогда не наблюдаемые у здоровых особей. Визуальное наблюдение за скоростью меланизации гемолимфы, отобранной в стеклянные капилляры, показало, что за 2—3 мин инкубации при комнатной температуре гемолимфа контрольных гусениц окрашивалась в черный цвет, в то время как гемолимфа гусениц больных микроспоридиозом оставалась беловато-прозрачной в течение 20 мин вплоть до высыхания образца, что свидетельствует о подавлении реакции меланизации у больных гусениц. При вскрытии зараженных гусениц и анализе полутонких срезов не было выявлено меланизации и инфильтрации гемоцитами инвазированных тканей внутренней среды.

Влияние условий содержания гусениц и хранения спор на заражение микроспоридиями. Содержание гусениц ($N = 25$), зараженных свежими спорами, при $t = 32^\circ$ в течение 3 дней, начиная с момента заражения, привело к полному блокированию развития микроспоридий. Гусеницы успешно развивались, пройдя все стадии развития, а из вылетевших бабочек были получены яйцекладки. У гусениц второго поколения ($N = 28$) микроспоридии обнаружены не были.

У гусениц III и IV возрастов, содержавшихся при $t = 28\text{--}30^\circ$ и зараженных спорами, которые до этого сохранялись в течение 3 и 6 мес в виде водной суспензии при $t = 4^\circ$, также не наблюдали повышенной смертности и нарушений метаморфоза. Развивавшиеся из таких личинок бабочки нормально откладывали яйца (табл. 1). В том случае, когда гусеницы III возраста в течение 5 дней после заражения содержались при $t = 25^\circ$, их смертность в течение последующих 27 дней повысилась по сравнению с контролем (6.3 %) примерно в 10 раз и составила 63 % при заражении трехмесячными спорами и 61.5 % — при заражении шестимесячными (табл. 2). Пятидневное содержание гусениц при $t = 21^\circ$ привело к значительному росту смертности: в экспериментальной группе насекомых на 14-е сут погибло 69 % насекомых, тогда как в контрольной эта величина не превысила 10 % (табл. 3).

Нам не удалось заразить гусениц *G. mellonella* спорами, выделенными из высушенных трупов или из трупов, хранившихся в замороженном состоянии в течение 14 дней. Окрашивание спор, выделенных из живых гусениц и из высушенных трупов, акридиновым оранжевым показало, что эти пробы разительно отличаются друг от друга. В образцах, полученных из живых насекомых, содержались лишь единичные споры, дающие красную флю-

Таблица 1

Устойчивость гусениц к заражению спорами при содержании при постоянной $t = 28\text{--}30^\circ$

Table 1. Resistance of the caterpillars to the infecting by spores with cultivation under constant temperature $28\text{--}30^\circ\text{C}$

Возраст гусениц	Дни после заражения и количество погибших насекомых				
	3	15	19	23	26
L III контроль ($N = 10$)					(вылет имаго)
L III опыт ($N = 18$)		2			1 » »
L IV контроль ($N = 8$)		(вылет имаго)			
L IV опыт ($N = 8$)	1	» »			1

Таблица 2

Влияние срока хранения спор *Vairimorpha ephestiae*
на смертность гусениц *Galleria mellonella* III возраста, содержащихся при 25°
в течение первых 5 дней после заражения

Table 2. Effect of the storage period of *Vairimorpha ephestiae* spores on the mortality
of *Galleria mellonella* III stage caterpillars being cultivated under 25 °C
during the first 5 days after infection

Продолжительность хранения спор	Дни после заражения и количество погибших насекомых							Общая смерт- ность, %
	10	16	17	18	23	25	27	
Контроль (N = 16)	1							6.3
Споры 6 мес. (N = 26)	5	3	2	1	5		1	61.5
Споры 3 мес. (N = 27)	6	2	1	1	1	4	2	63

Примечание. Гусениц содержали при t = 25° в течение 5 дней, оставшееся время — при t = 30°.

оресценцию, что свидетельствовало о нежизнеспособности последних. Таким образом, в этих пробах явно доминируют нормальные инвазионные споры. В то же время споры, выделенные из высушенных трупов, все без исключения давали красное свечение (рис. 4). Спорами, выделенными из засушенных, а также замороженных в течение 2 недель трупов, заразить гусениц II—III возраста не удалось. Таким образом, при хранении в подобных условиях споры полностью утрачивают инфекционность.

Характерно, что ни в одном из образцов спор, выделенных из 130 гусениц, в том числе из 67 гусениц, содержащихся часть времени или постоянно при субоптимальной температуре (21—26 °C), не найдено октоспор, характерных для жизненного цикла микроспоридий рода *Vairimorpha*.

Стимуляция экстрезии полярных трубок. Использование метода щелочной обработки спор микроспоридий с последующей нейтрализацией вызывало в течение 30 мин экстрезию 72.1 ± 2.24 и 63.2 ± 2.33 % спор, хранившихся при t = +4° в водной суспензии на протяжении 3 и 6 мес. соответственно. В инкубационной среде среди выстреливших спор наблюдали округлые стадии развития микроспоридий, соответствующие спороплазмам (стадиям, непосредственно инъецируемым спорами в клетки хозия) или меронтам, каковые образуются при трансформации спороплазм и имеют четко различимый ядерный аппарат (рис. 5).

Таблица 3

Влияние срока хранения спор *Vairimorpha ephestiae*
на смертность гусениц *Galleria mellonella* III возраста,
содержавшихся в течение первых 5 дней после заражения при t = 21°

Table 3. Effect of the storage period of *Vairimorpha ephestiae* spores on the mortality
of *Galleria mellonella* III stage caterpillars being cultivated under 21 °C
during the first 5 days after infection

Продолжительность хранения спор	Дни после заражения и количество погибших насекомых						Общая смерт- ность, %
	4	6	7	12	14	20	
Контроль (N = 19)	2						10.5
Споры 3 мес. (N = 23)	3	4	2	5	4	3	91.0

Примечание. Гусениц содержали при t = 21° в течение 5 дней, оставшееся время — при t = 30°.

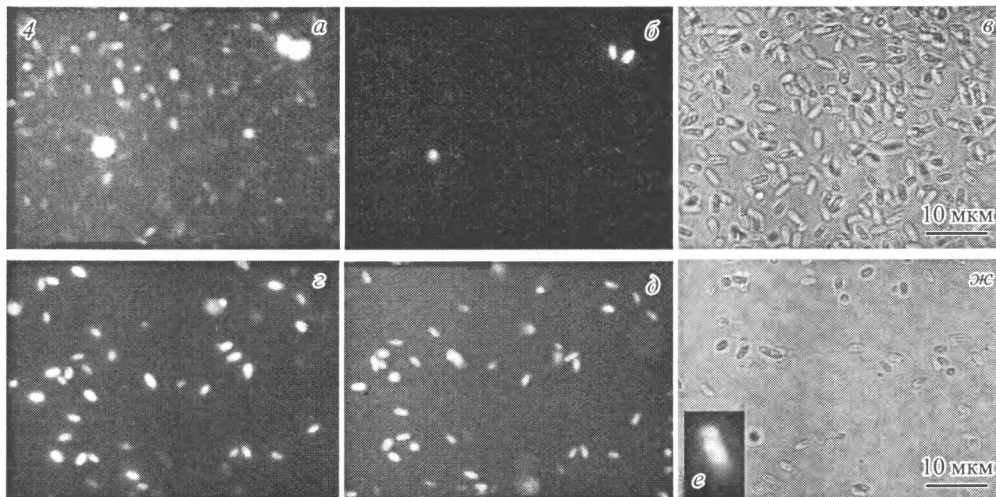


Рис. 4. Споры микроспоридии *V. ephestiae*, выделенные из живых гусениц *G. mellonella* (a—c) и трупов гусениц (d—ж). Окрашивание акридиновым оранжевым.
a, z — зеленая флюоресценция; б, d — красная флюоресценция; в, ж — проходящий свет; e — нежизнеспособная спора, дающая красную флюоресценцию, увеличено.

Fig. 4. Spores of the microsporidia *V. ephestiae* extracted from alive *G. mellonella* caterpillars (a—c) and the caterpillar carcasses (d—g). Acridine orange staining.

ОБСУЖДЕНИЕ

Способность заражать насекомых как перорально, так и путем инъекции известна для многих микроспоридий. Считается, что инъектирование спор способно расширить потенциальный круг хозяев данного вида микроспоридий. Хотя этот метод более трудоемок, он позволяет использовать для заражения гусениц последних возрастов и минимальное количество инфекционного материала (Vavra, Maddox, 1976; Weiser, 1978; Исси, 1980).

Гипертрофия жирового тела и массовое образование спор свидетельствуют о развитии «типичного» заражения микроспоридией (Solter, Maddox, 1998b), для которой данный хозяин — пчелиная огневка — оказался вполне подходящим. Сравнительно быстрые сроки наступления конечной фазы заболевания позволяют за небольшой период времени наработать максимальное количество спор.

При изучении паразитирования *V. ephestiae* ни в мельничной, ни в пчелиной огневке (Weiser, Puttini, 1985) не было выявлено развития паразитов в эпителии кишечника на ранних сроках инвазии, что было описано для ряда видов микроспоридий, относящихся к родам *Nosema* и *Vairimorpha* (Solter, Maddox, 1998a). С одной стороны, мы могли пропустить эту кратковременную начальную стадию заболевания, в частности, из-за быстрого обновления эпителия средней кишки, а с другой — возможно, заражение эпителия кишечника отнюдь не универсальное явление в жизненных циклах микроспоридий, тем более что длина полярной трубки (до 400 мкм) позволяет инвазировать ткани внутренней среды при выстреливании спор в просвете кишечника.

Мы не обнаружили гаплоидные октоспоры (мейоспоры), описанные при развитии данного вида микроспоридии в своем естественном хозяине — мельничной огневке. Это может указывать на то, что жизненные циклы одного и того же вида микроспоридии могут по-разному протекать в естественном и экспериментальном хозяевах — в *G. mellonella* осуществляется только агамная часть цикла микроспоридии *V. ephestiae*, тогда как половой процесс с последующим мейозом и формированием мейоспор по каким-то причинам выпал.

Основное место поселения паразитов и созревания спор микроспоридии *V. ephestiae* — жировое тело. Как у многих микроспоридий насекомых, инвазия паразитов приводит к плотному заселению большей части цитоплазмы адипоцитов (Weissenberg, 1976; Исси, 1986; Becnel, Andreadis, 1999) и замещению ее содержимого спорами. В первую очередь происходит исчезновение липидных гранул, вероятно, как результат интенсификации процессов аэробного метаболизма хозяина для возмещения энергетического ущерба, нанесенного развивающимися паразитами (Долгих, 1997).

Повышение относительной доли свободно-циркулирующих прогемоцитов, способных к образованию зрелых функциональных гемоцитов — распространенная реакция гемолимфы насекомых при патогенезе (Глулов и др., 1997). Усиленная пролиферация стволовых клеток способствует восстановлению пула гемоцитов при их истощении из циркуляции вследствие участия в клеточных реакциях иммунитета. Для некоторых микроспоридий показана способность индуцировать лимфопролиферативные заболевания животных-хозяев с помощью выделения зараженными клетками цитокин-подобных соединений (Wongtawatchai et al., 1995). Многоядерные циркулирующие клетки, образованные в результате слияния нескольких гемоцитов, отмечены при вириозах насекомых (Бахвалов, 2001). У некоторых выс-

ших позвоночных микроспоририоз вызывает нарушения клеточного цикла, в результате чего образуются многоядерные клетки (Didier, Bessinger, 1999). Образование многоядерных клеток в гемолимфе зараженных микроспоририозом гусеницах галлерии также явно связано с заболеванием, но каким образом формируются эти структуры, пока не понятно.

Другой интересный феномен, выявленный при микроспоририозе *G. mellonella* — ингибирование меланизации. Обычно гемолимфа пчелиной огневки, как и ряда других чешуекрылых, быстро меланизируется на воздухе при повреждении покровов. Этот процесс опосредован фенолоксидазной системой, неразрывно связанной с комплексом защитных реакций насекомых (Ashida, Yamazaki, 1990; Gillespie et al., 1997; Глупов, 2001). Появление меланиновых пятен под кутикулой характерно для ряда микроспоририозов чешуекрылых и рассматривается как защитная реакция организма хозяина (реакция аттретизации), связанная с локализацией части спор под покровами, с которыми споры в дальнейшем удаляются при линьке насекомых (Weiser, 1969; Исси, 1986). Интересно, что при вскрытии зараженных гусениц и анализе полутонких срезов мы не наблюдали инфильтрации зараженных тканей гемоцитами, характерной для протозойных и грибных инфекций насекомых (Hajek, St. Leger, 1994; Паскерова и др., 1998; Bidochka, Hajek, 1998). При микроспоририозе двупятнистого сверчка, зараженного *Nosema grylli*, такая реакция наблюдается при разрушении зараженных клеток и попадании части спор в гемолимфу (Токарев, 2003). Отсутствие реакций меланизации в зараженных тканях галлерии на ранних этапах микроспоририоза, скорее всего, связано с избеганием микроспоририями защитных реакций хозяина за счет внутриклеточной локализации. На этапе острого микроспоририоза, характеризующегося деструктивными процессами в зараженных тканях и соответственно возникновением контакта спор с гемолимфой, отсутствие защитных реакций может быть объяснено подавлением фенолоксидазной системы гемолимфы, опосредующей каскад меланизации.

Для данной паразито-хозяинной системы уже было показано подавление фенолоксидазной активности гемолимфы насекомого под действием паразита, что и объясняет отсутствие меланизации гемолимфы (Лозинская, 2002). Двукратное снижение относительной доли фенолоксидазоположительных гемоцитов и соответствующее подавление меланизации гемолимфы также выявлены при микроспоририозе двупятнистого сверчка, вызванном *N. grylli* (Соколова и др., 2000; Токарев, 2003). Способность ингибировать фенолоксидазную систему беспозвоночных свойственна разным по своей природе патогенам (Brennan, Cheng, 1975; Dunphy, 1994; Brivio et al., 2002; Slepneva et al., 2003); при микроспоририозах насекомых это явление изучено недостаточно. Возможно, именно на данной модели паразито-хозяинной системы, для которой достаточно подробно изучены компоненты фенолоксидазного каскада насекомого-хозяина (Korasek et al., 1995; Li et al., 2002), в дальнейшем удастся объяснить механизм вышеописанного феномена.

Температурный режим — один из важнейших параметров, определяющих восприимчивость насекомых к микроспоририозу. Наиболее интенсивное развитие паразита при минимальной смертности хозяина происходит при оптимальных для хозяина температурах (Елфимова, 1985; Исси, 1986). Усиление патогенного воздействия микроспориридий на насекомых обычно более выражено при снижении температуры (Hurpin, 1968; Листов, 1976; Исси, 1986). На примере пчелиной огневки нам удалось показать, что критическим периодом в этом отношении могут быть первые несколько дней с момента заражения. Содержание насекомых в этот период при понижен-

ной температуре делает их более восприимчивыми к заражению и усиливает смертность даже при использовании спор со сниженной инфекционностью. Причины такого воздействия температуры могут быть заключены в ослаблении защитных функций организма, проявляющемся, в частности, на уровне функциональной активности гемоцитов, продуцирующих активные кислородные метаболиты (Дубовский, Глупов, 1997).

Важное практическое значение имеет определение условий, при которых утрачивается жизнеспособность и инфекционность спор. Замораживание или высушивание инфекционного материала инактивирует споры *V. ephesiae*, а при долговременном хранении в водной суспензии на холоде инфекционность сохраняется. Эти закономерности наблюдаются у многих видов микроспоридий (Vavra, Maddox, 1976).

Для экспериментов, связанных с выделением полярных трубок и спороплазм из спор микроспоридий, а также для искусственного заражения культивируемых клеток *in vitro* необходим подбор условий стимуляции выстреливания спор. В случае *V. ephesiae* высокий уровень экстразии спор был достигнут при использовании методики Куртти и др. (Kurtti et al., 1994), исходно разработанной для *N. furnacalis* и успешно адаптированный для *N. grylli* (Dolgikh, Semenov, 2003). Это позволит в дальнейшем проводить эксперименты по культивированию микроспоридий *in vitro*.

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 03-04-48310, 03-04-49629 и НШ-1038.2003.4).

Список литературы

- Бахвалов С. А. Вироzy насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год, 2001. С. 20—75.
- Глупов В. В. Механизмы резистентности насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год, 2001. С. 475—561.
- Глупов В. В., Хвощевская М. Ф., Щепеткин И. А., Крюкова Н. А. Морфофункциональная структура популяции гемоцитов *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при инфекционном процессе // Изв. АН. Сер. биол. 1997. № 6. С. 645—653.
- Долгих В. В. Особенности углеводного и энергетического обмена микроспоридий *Nosema grylli* и их патогенного воздействия на организм насекомого-хозяина: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1997. 19 с.
- Дубовский И. М., Глупов В. В. Влияние низкой температуры на популяционную структуру гемоцитов личинок большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. (Pyralidae; Lepidoptera) при инфекционном процессе // Регуляция численности беспозвоночных и фитопатогенов. Новосибирск, 1997. С. 33—38.
- Елфимова Т. Б. Оптимальные условия массового получения спор двух микроспоридий рода *Vairimorpha* в капустной совке: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Алма-Ата, 1985. 16 с.
- Исси И. В. Состояние вопроса и проблемы массового разведения микроспоридий // Сб. науч. тр. ВНИИЗР / Под ред. К. В. Новожилова. СПб.—Пушкин, 1980. С. 82—88.
- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Микроспоридии. Сер. протозоология. Вып. 10. Л.: Наука, 1986. С. 6—135.
- Листов М. В. Микроспоридиоз и кокцидиоз — протозойные заболевания малых хрущков (Coleoptera: Tenebrionidae) // Паразитология. 1976. Т. 10. С. 268—273.
- Логинов Е. В., Соколова Ю. Я., Громов А. Я. Ускоренный метод окраски полутонких срезов, залитых в аралдит // Цитология. 1988. Т. 30, вып. 1. С. 26—33.
- Лозинская Я. Л. Изменение активности детоксицирующих ферментов и антиоксидантного статуса личинок *Galleria mellonella* L. при микроспориidioзе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2002. 19 с.

- ПаскEROва Г. Г., Соколова Ю. Я., Добровольский А. А. Особенности патогенеза жирового тела сверчка *Gryllus bimaculatus* при кокцидиозе, вызванном аделеидной кокцидией *Adelina grylli* // Паразитология. 1998. Т. 32, вып. 5. С. 457—463.
- Плохинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.
- Соколова Ю. Я., Селезнев К. В., Долгих В. В., Исси И. В. Микроспоридия *Nosema grylli* n. sp. из сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 6. С. 488—493.
- Соколова Ю. Я., Токарев Ю. С., Лозинская Я. Л., Глупов В. В. Морфофункциональный анализ гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) в норме и при остром микроспориidioзе, вызываемом *Nosema grylli* // Паразитология. 2000. Т. 34, вып. 5. С. 408—419.
- Тамарина Н. А. Техническая энтомология — новая отрасль прикладной энтомологии // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Энтомология. 1987. Т. 7. С. 248.
- Токарев Ю. С. Иммунные реакции гемолимфы прямокрылых насекомых при микроспориidioзе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2003. 20 с.
- Ashida M., Yamazaki H. I. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation // Molting and metamorphosis / Ed. by E. Ohnishi, H. Ishizaki. Tokyo, Berlin: Japan Sci. Soc. Press, Springer-Verlag, 1990. P. 239—265.
- Becnel J. J., Andreadis T. G. Microsporidia in insects // The microsporidia and microsporidiosis / Ed. by M. Wittner. Washington: D. C., 1999. P. 447—501.
- Bidochka M. J., Hajek A. E. A nonpermissive entomophthorlean fungal infection increases activation of insect prophenoloxidase // Journ. Invertebr. Pathol. 1998. Vol. 72. P. 231—238.
- Brennan B. M., Cheng T. S. Resistance of *Moniliformis dubius* to the defense reactions of the American cockroach, *Periplaneta Americana* // Journ. Invertebr. Pathol. 1975. Vol. 26. P. 65—73.
- Brivio M. F., Pagani M., Restelli S. Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle // Exp. Parasitol. 2002. Vol. 101. P. 149—156.
- Didier E. S., Bessinger G. T. Host-parasite relationships in microsporidiosis: animal models and immunology // The microsporidia and microsporidiosis / Ed. by M. Wittner. Washington: D. C., 1999. P. 225—257.
- Dolgikh V. V., Semenov P. B. The spore wall and polar tube proteins of the microsporidian *Nosema grylli*: the major spore wall protein is released before spore extrusion // Cytologia. 2003. Vol. 45, N 3. P. 324—329.
- Dunphy G. B. Interaction of mutants of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) with antibacterial systems of *Galleria mellonella* larvae (Insecta: Pyralidae) // Can. Journ. Microbiol. 1994. Vol. 40. P. 161—168.
- Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. Biological mediators of insect immunity // Ann. Rev. Entomol. 1997. Vol. 42. P. 611—643.
- Glupov V. V., Khvoshevskaya M. F., Lozinskaya Ya. L., Dubovski I. M., Martemyanov V. V. Application of the method NBT-reduction for studies on the production of reactive oxygen species in insect haemocytes // Cytobios. 2001. Vol. 106. P. 165—178.
- Hajek A. E., St. Leger R. J. Interaction between fungal pathogens and insect hosts // Ann. Rev. Entomol. 1994. Vol. 9. P. 293—322.
- Hurpin B. The influence of temperature and larval stage on certain diseases of *Melolontha melolontha* // Journ. Invertebr. Pathol. 1968. Vol. 10. P. 252—262.
- Kopacek P., Weise C., Gotz P. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme // Insect Biochem. Mol. Biol. 1995. Vol. 25. P. 1081—1091.
- Kurtti T. J., Ross S. B., Liu Y., Munderloh U. G. In vitro developmental biology and spore production in *Nosema furnacalis* (Microspora: Nosematidae) // Journ. Invertebr. Pathol. 1994. Vol. 15. P. 43—48.
- Leonard C., Soderhall K., Ratcliffe N. A. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes // Insect Biochem. 1985. Vol. 15. P. 803—810.
- Li D., Scherfer C., Korayem A. M., Zhao Z., Schmidt O., Theopold U. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade // Insect Biochem. Mol. Biol. 2002. Vol. 32. P. 919—928.
- Seitz V., Clermont A., Wedde M., Hummel M., Vilcinskas A., Schlatterer K., Podsiadlowski L. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth

- (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach // *Dev. Comp. Immunol.* 2003. Vol. 27. P. 207–215.
- Slepneva I. A., Komarov D. A., Glupov V. V., Serebrov V. V., Khrantsov V. V. Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 300. P. 188–191.
- Solter L. F., Maddox J. V. Physiological host specificity of microsporidia as an indicator of ecological host specificity // *Journ. Invertebr. Pathol.* 1998a. Vol. 71. P. 207–216.
- Solter L. F., Maddox J. V. Timing of an early sporulation sequence of microsporidia in the genus *Vairimorpha* (Microsporidia: Burenellidae) // *Journ. Invertebr. Pathol.* 1998b. Vol. 72. P. 323–329.
- Undeen A. H., Vavra J. Research methods for entomopathogenic protozoa // *Manual of techniques in insect pathology.* San Diego, Toronto: Academic Press, 1997. P. 117–150.
- Vavra J., Maddox J. V. Methods in microsporidiology // *Comparative pathobiology.* New York–London, 1976. Vol. 1. P. 281–319.
- Weidner E., Sibley L. D. Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion // *Journ. Protozool.* 1985. Vol. 32. P. 311–317.
- Weiser J. Immunity of insects to Protozoa // *Immunity to parasitic animals* / Ed. by G. J. Jackson, R. Herman, I. Singer. New York, 1969. P. 129–147.
- Weiser J. Transmission of microsporidia to insects via injection // *Spol. Zool.* 1978. Vol. 42. P. 311–317.
- Weiser J., Purrini K. Light- and electron-microscopic studies on the microsporidian *Vairimorpha ephestiae* (Mattes) (Protozoa, Microsporidia) in the meal moth *Ephestia kühniella* // *Arch. Protistenk.* 1985. Bd 130. S. 179–189.
- Wiesner A. Induction of immunity by latex beads and by hemolymph transfer in *Galleria mellonella* // *Dev. Comp. Immunol.* 1991. Vol. 15. P. 241–250.
- Weissenberg R. Microsporidian interactions with host cells // *Comparative pathobiology.* New York–London, 1976. Vol. 1. P. 204–227.
- Wongtavatchai J., Conrad P. A., Hedrick R. P. In vitro characteristics of the microsporidian: *Enterocytozoon salmonis* // *Journ. Euk. Microbiol.* 1995. Vol. 42. P. 401–405.
- Yu K. H., Kim K. N., Lee J. H., Lee H. S., Kim S. H., Cho K. Y., Nam M. H., Lee I. H. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli* // *Dev. Comp. Immunov.* 2002. Vol. 26. P. 707–713.

Институт систематики и экологии животных СО РАН,
Новосибирск,
ВИЗР РАСХН,
Санкт-Петербург,
Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург

Поступила 12 I 2004

MICROSPORIDIOSIS IN THE WAX MOTH GALLERIA MELLONELLA (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) CAUSED BY VAIRIMORPHA EPHESTIAE (MICROSPORIDIA: BURENELLIDAE)

Ya. L. Vorontsova, Yu. S. Tokarev, Yu. Ya. Sokolova, V. V. Glupov

Key words: microsporidiosis, *Vairimorpha ephestiae*, Microsporidia, host-parasite relationships.

SUMMARY

An experimental microsporidiosis of the wax moth caterpillars from laboratory population had been caused by oral infecting of early stages larvae and by intracavity injections of the spores of the microsporidian species *Vairimorpha ephestiae*. Peculiarities of microsporidiosis proceeding, manifestations of host defence reactions, and also an effect of the temperature of caterpillars cultivation and conditions of spores keeping on liability of the in-

sects to the infection were studied. The effect of the microsporidia on the host organism was the early death or the delay of larvae development, but in several cases external manifestations of the effect of the parasite on the host were absent. The development of the parasites from the moment of infecting to the appearing of the mature spores congestions in the host organism proceeded 6 days. Microsporidia invaded insect fat body and caused its hypertrophy and disappearance of lipid granules. In the intestine and salivary glands microsporidia were not observed in the period from 6 to 16 day of the development. On the final stage of microsporidiosis the all contents of fatty tissue cells were replaced by spores of microsporidia. Under microscope only diplocaryotic spores of the *Nozema* type had been found in infected and died specimens, but not octospores. The spores threw out polar tubes under the change of pH in incubating solution from neutral to alkaline. The effects of microsporidiosis on the wax moth haemolymph were the increased rate of prohaemocytes, appearing of multinuclear free-circulating cells at 6 day after infection, and suppression of the reaction of haemolymph melanization with the mass sporogenesis of the parasite. The characteristic symptom of the wax moth microsporidiosis had been revealed, accumulation of black points and small spots of irregular form under cuticle («reaction of attretization»). Increase of the temperature of insect cultivation up to 32 °C during 3 days after infection contributed to the full deliverance of the insects from the infection in first and second generations. It can be considered as a method of treatment of wax moth laboratory colonies from microsporidiosis. Oral infection of III and IV stage caterpillars by the spores being kept during 3—6 months under 4 °C in form of water suspension caused the death of 63.0—61.5 and 91 % of caterpillars being cultivated under 25 and 21 °C respectively. Under the temperature of cultivation equal 30 °C the mortality did not differed from the control sample (8—10 %). The spores extracted from dried bodies of caterpillars lost their vitality. It was demonstrated by the test on infectious ability *in vivo* and by acridine orange staining. This host-parasite system appears to be perspective in investigations of resistance mechanisms in insects and immunosuppressive features of entomopathogen microsporidia.
